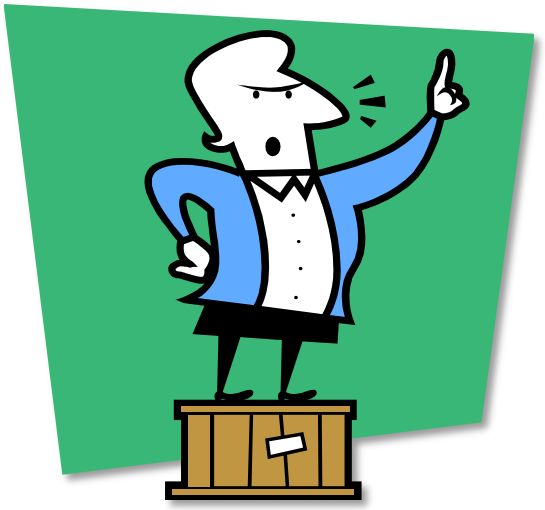
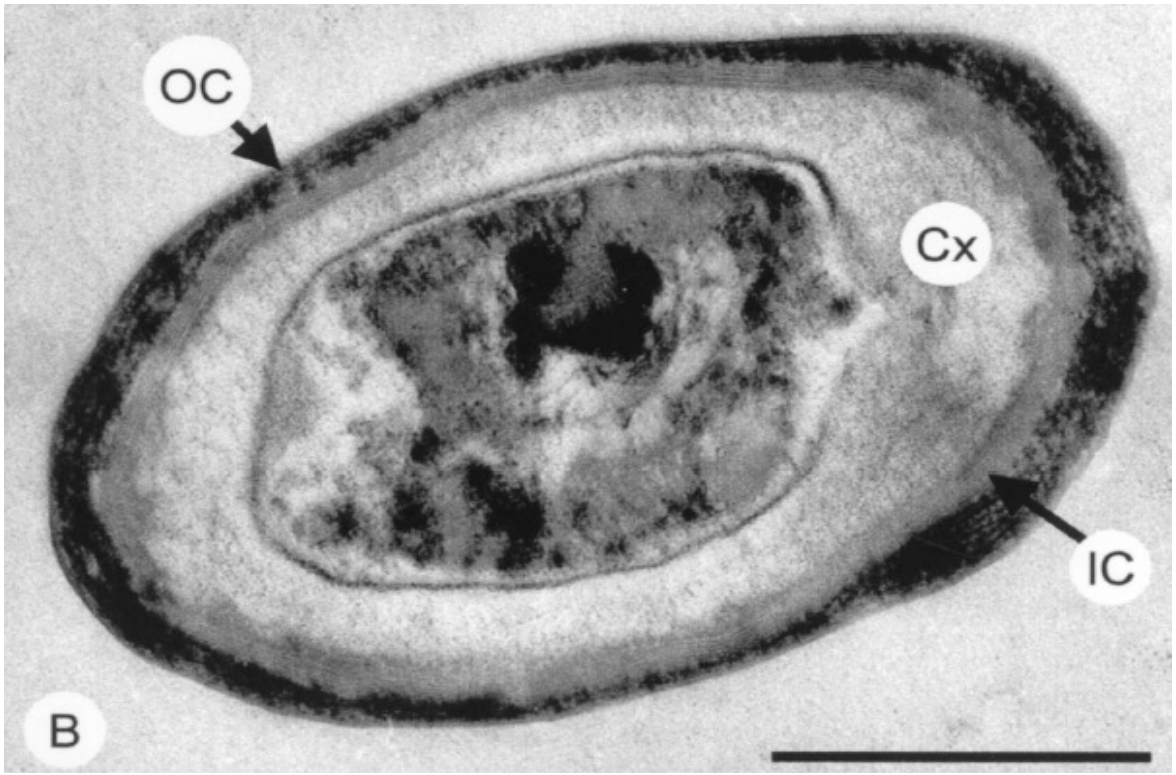
Thema der Vorlesung



Sporen
Sporenbildung

Aufbau der *Bacillus* Endospore



Cx: Cortex

Peptidoglykan-Schicht

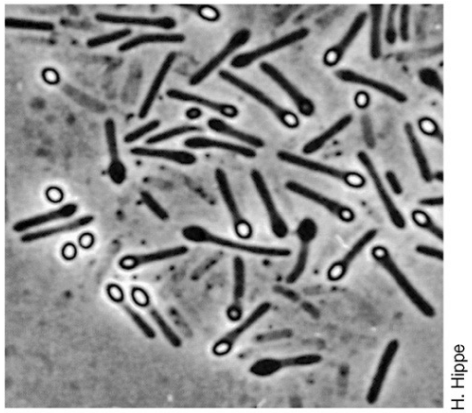
IC: Inner coat

OC: Outer coat

Sporenhülle

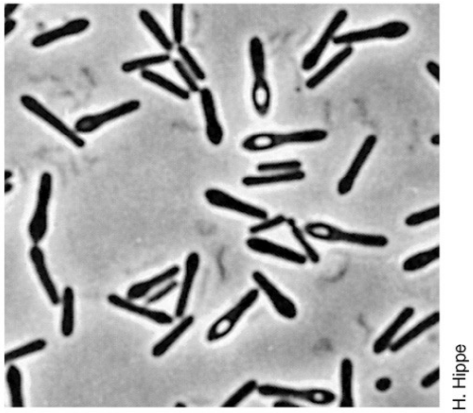
Die bakterielle **Endospore**

Phasenkontrastaufnahmen, die mehrere Morphologien von Endosporen und intrazelluläre Lokalisationen der Endosporen darstellen



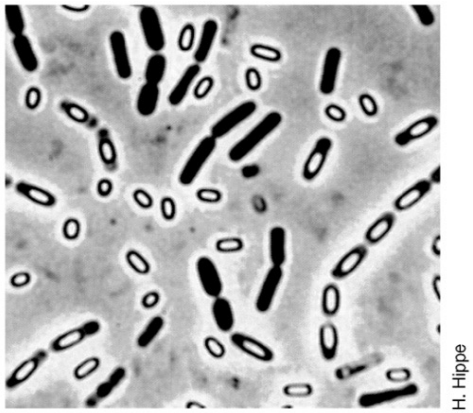
(a)

(a) terminal



(b)

(b) subterminal



(c)

(c) zentral

Endosporenbildung

Bekannteste Beispiele:

- ***Bacillus***
- **Paenibacillus**
- ***Sporosarcina***
- ***Clostridium***
- ***Desulfotomaculum***
- ***Sporolactobacillus***
- **Thermoanaerobacter**
- **Anaerobacter**
- **Alicyclobacter**
- **Heliobacterium**
- **Sporohalobacter**

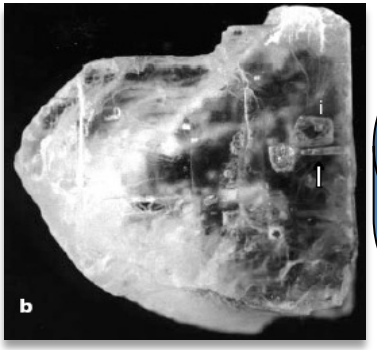
- **Sporomusa (gram-negativ)**

Extreme Langlebigkeit von Endosporen

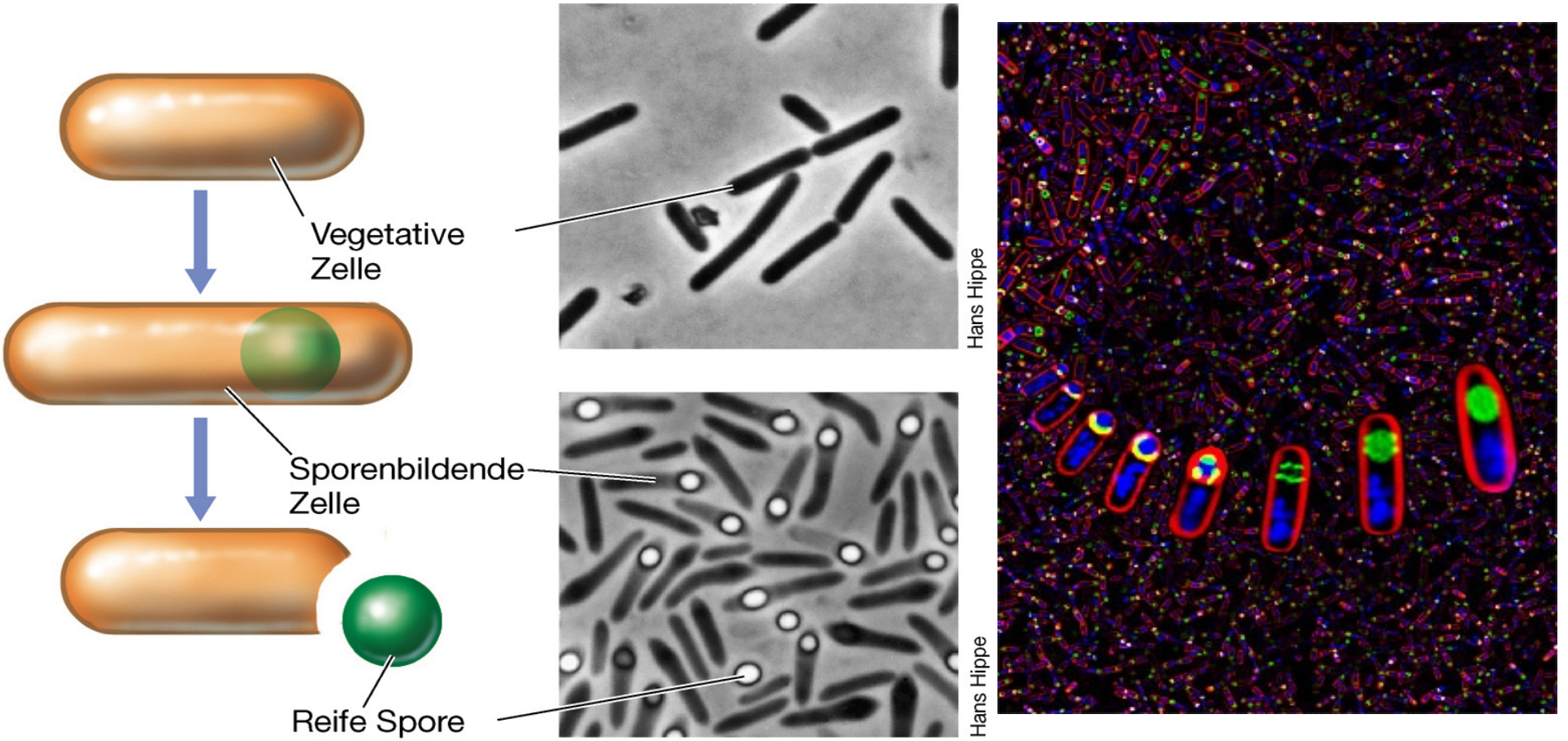
- **1995*:* Endosporen, isoliert aus vor 25-40 Mio Jahren in Bernstein eingeschlossenen Bienen (Dominikanische Republik), sind lebensfähig!**

Bacillus sphaericus

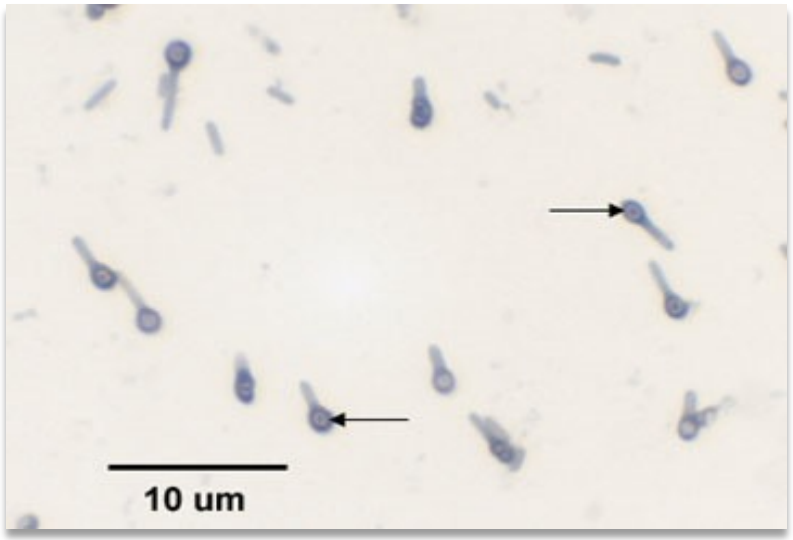
- **2000: Endosporen aus 250 Mio Jahre alten Salzkristallen (Salado, New Mexico, USA) sind lebensfähig!**



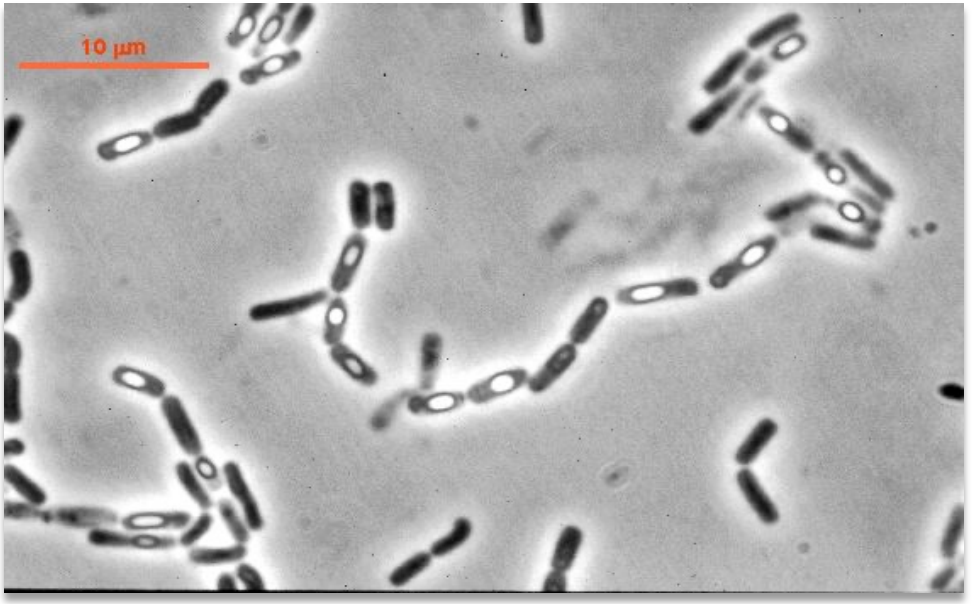
Bacillus marismortui


Vegetative
Zelle
Sporenbildende
Zelle
Reife Spore
Hans Hippe
Hans Hippe

Endosporen

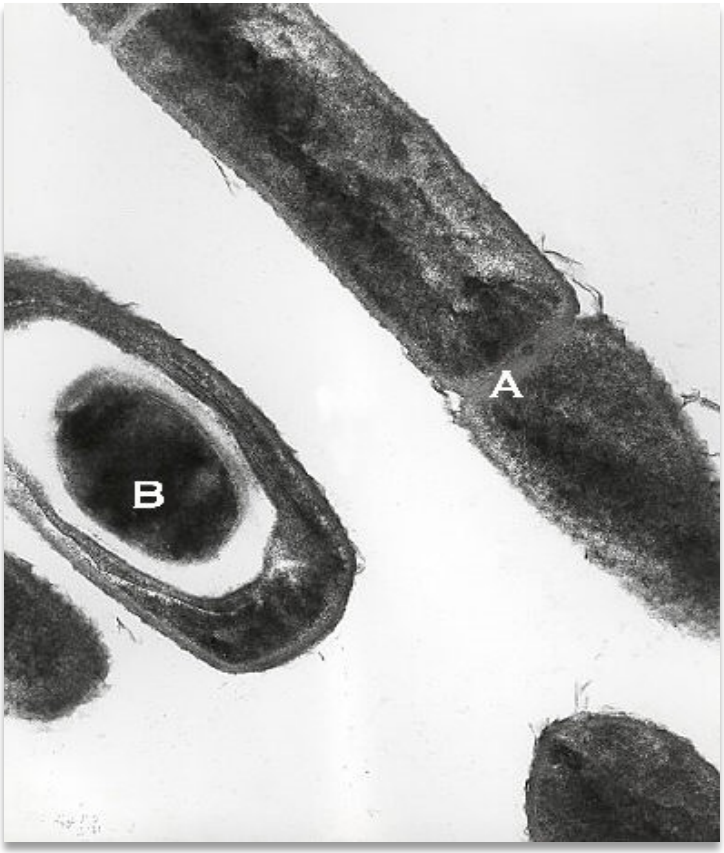


Clostridium tetani

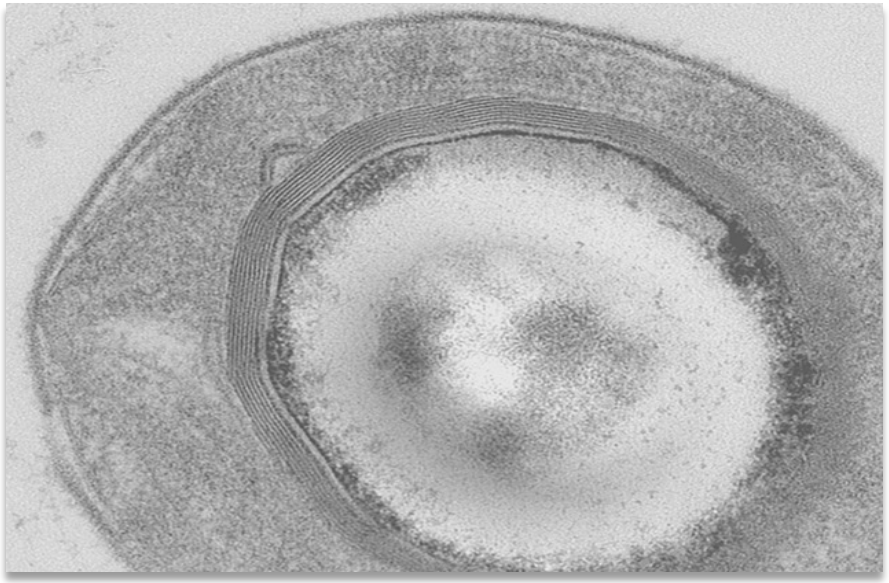


Bacillus fastidiosus

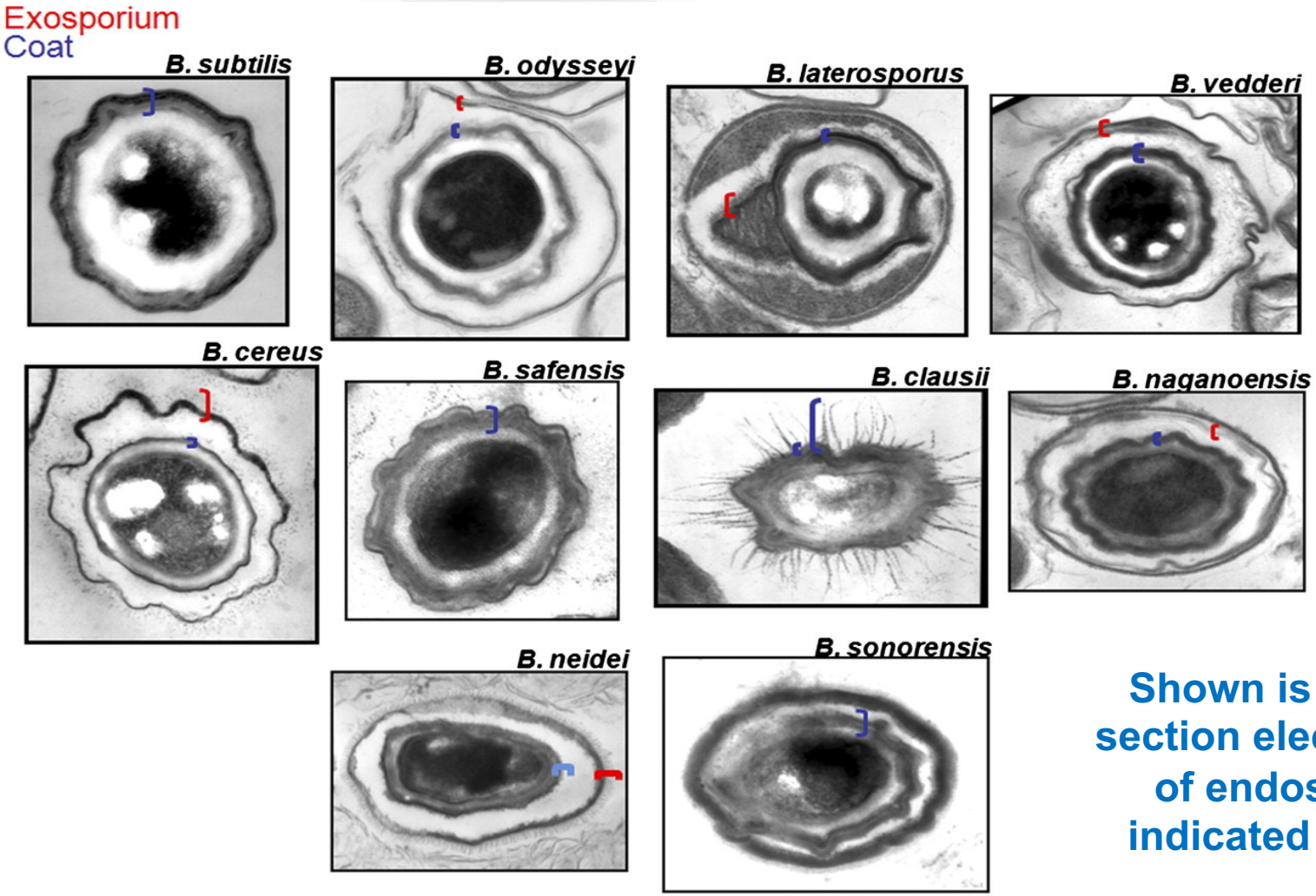
Endosporen



Bacillus spec.



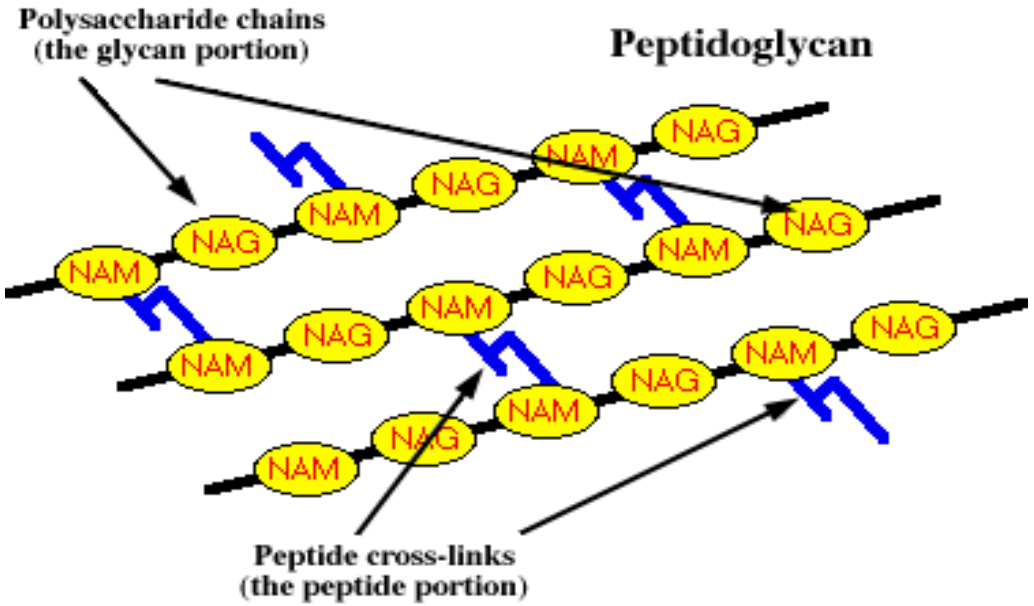
Bacillus subtilis



Shown is a gallery of thin-section electron micrographs of endospores from the indicated Bacillus species

Traag B A et al. PNAS 2010;107:878-881

Der Cortex der Spore besteht aus Peptidoglykanen

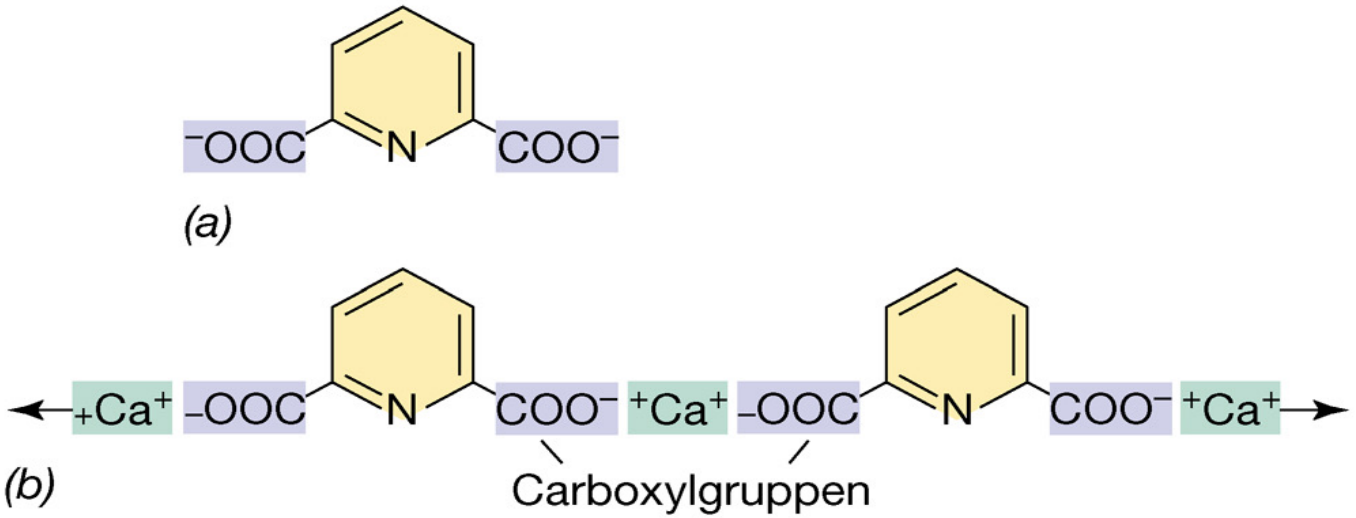


NAG: N-Acetylglucosamin

NAM: N-Acetylmuraminsäure

wichtig für Dehydrierung und Hitzeresistenz

Bildung von Dipicolinsäure, wird als Ca^{2+} Komplex eingelagert (bis zu 15% des Trockengewichts)



Dipicolinsäure (DPA)

(a) Struktur der DPA
(b) Wie Ca^{2+} mit DPA-Molekülen durch Quervernetzung einen Komplex bildet.

Wichtig auch für den Ruhezustand der Sporen und die Strahlungsresistenz

Eigenschaften von Endosporen

- metabolisch inaktiv

- stark dehydriert (Wassergehalt nur ca. 15%)

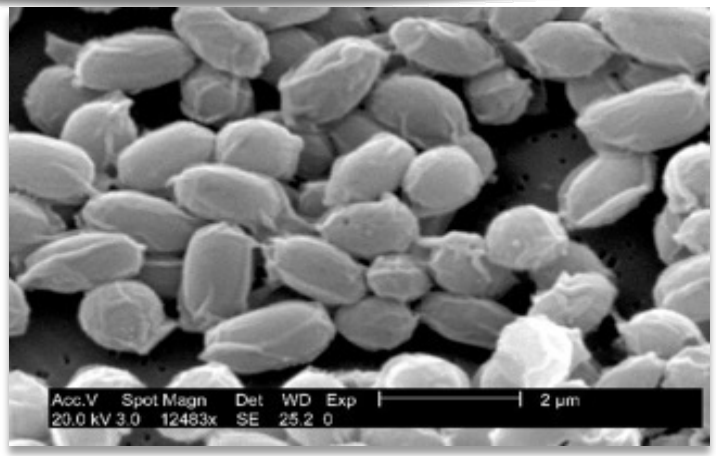
- sehr gut erkennbar im Phasenkontrastmikroskop:
  Sporen erscheinen sehr hell

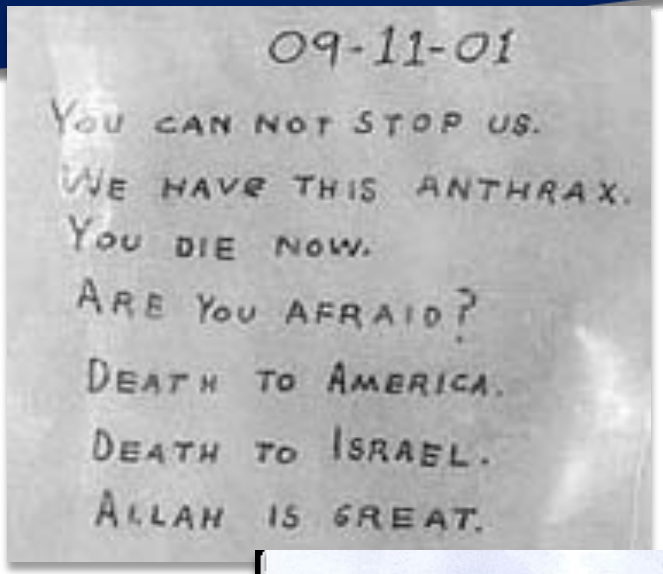
- hohe Resistenz gegen
  - extreme Temperaturen (Hitze, Kälte)
  - UV- und g- Strahlung
  - Trockenheit
  - Chemikalien (Säuren, Basen, organische Lösungsmittel)
  - hydrolytische Enzyme

Ursache der Hitzeresistenz der Endosporen

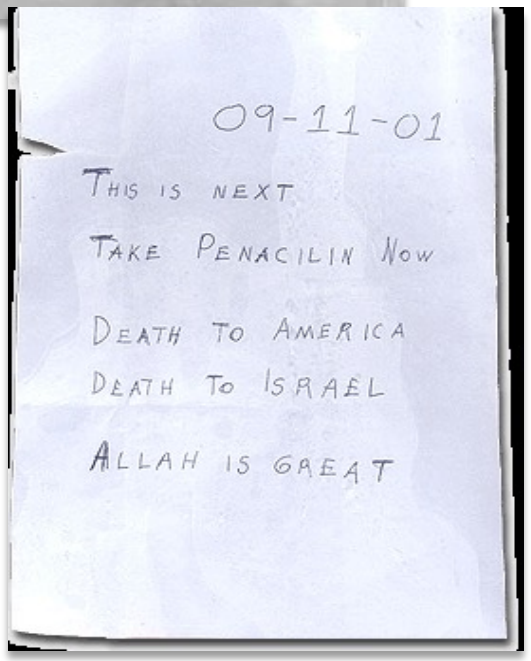
1. Dehydrierung (von ursprünglich 80% auf bis zu 15%)

2. Spezielle Verpackung der DNA mit bestimmten Proteinen:
   "small acid soluble proteins" (SASPs)





LETTER SENT TO:	NY	FL	DC
DATE MAILED:	Sept 18	Sept 18 (?)	Oct 9
NUMBER OF LETTERS:	2	1 (lost)	2
EARLIEST INFECTION:	Sept 22	Sept 27	Oct 13
PURITY:	10%	(?)	About 100%

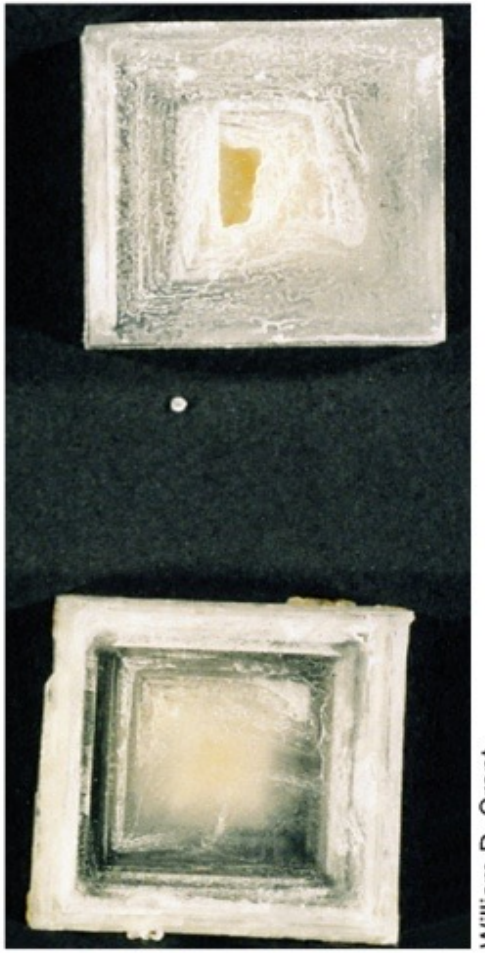


Langlebigkeit von Endosporen

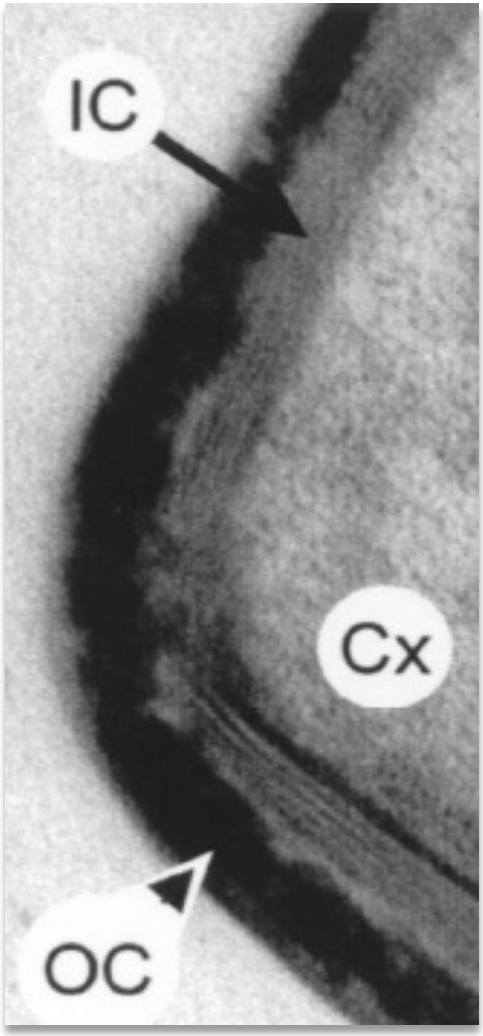
Aufnahme eines Röhrchens, das Endosporen des Bakteriums *Clostridium aceticum* enthält, die am 7. Mai 1947 präpariert wurden. Nachdem sie mehr als 30 Jahre im Ruhestand verharrten, wurden die Endosporen in einem Kulturmedium suspendiert, worauf sie innerhalb von zwölf Stunden zu wachsen begannen.

(b) *Halophile* Bakterien in einem Salzkristall eingeschlossen. Diese Kristalle (mit einem Durchmesser von ungefähr 1 cm) wurden im Labor in Gegenwart von Zellen des Halobacteriums (orange) gezüchtet,

(a)



(b)



Sporenhülle:

mehrere Schichten, bestehend vor allem aus vernetzten Polypeptiden (ca. 25 verschiedene Polypeptide)

- **innere Sporenhülle (IC)**
  relativ hell, lamellenförmig
- **äussere Sporenhülle (OC)**
  dunkel

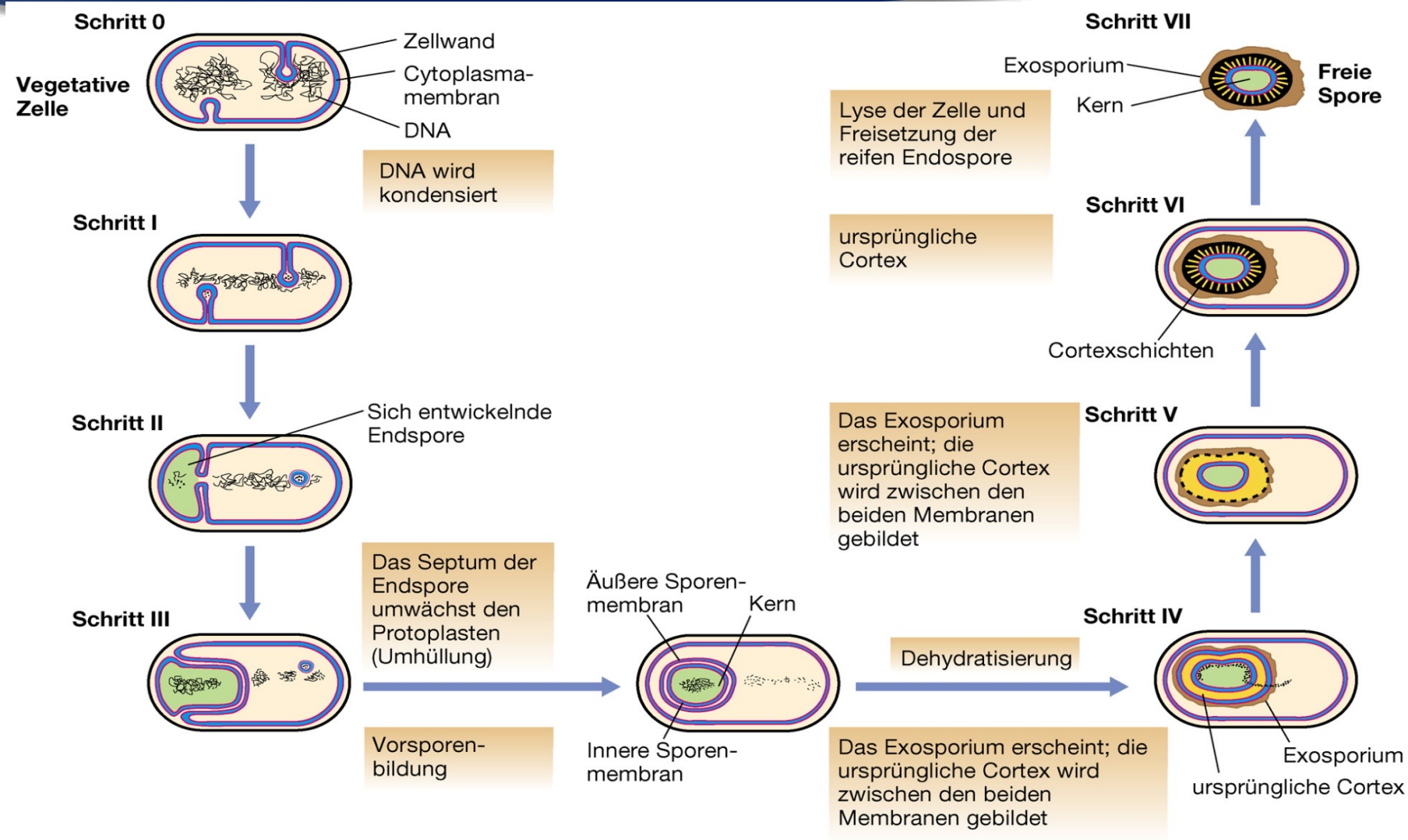
Aufgabe der Sporenhülle:

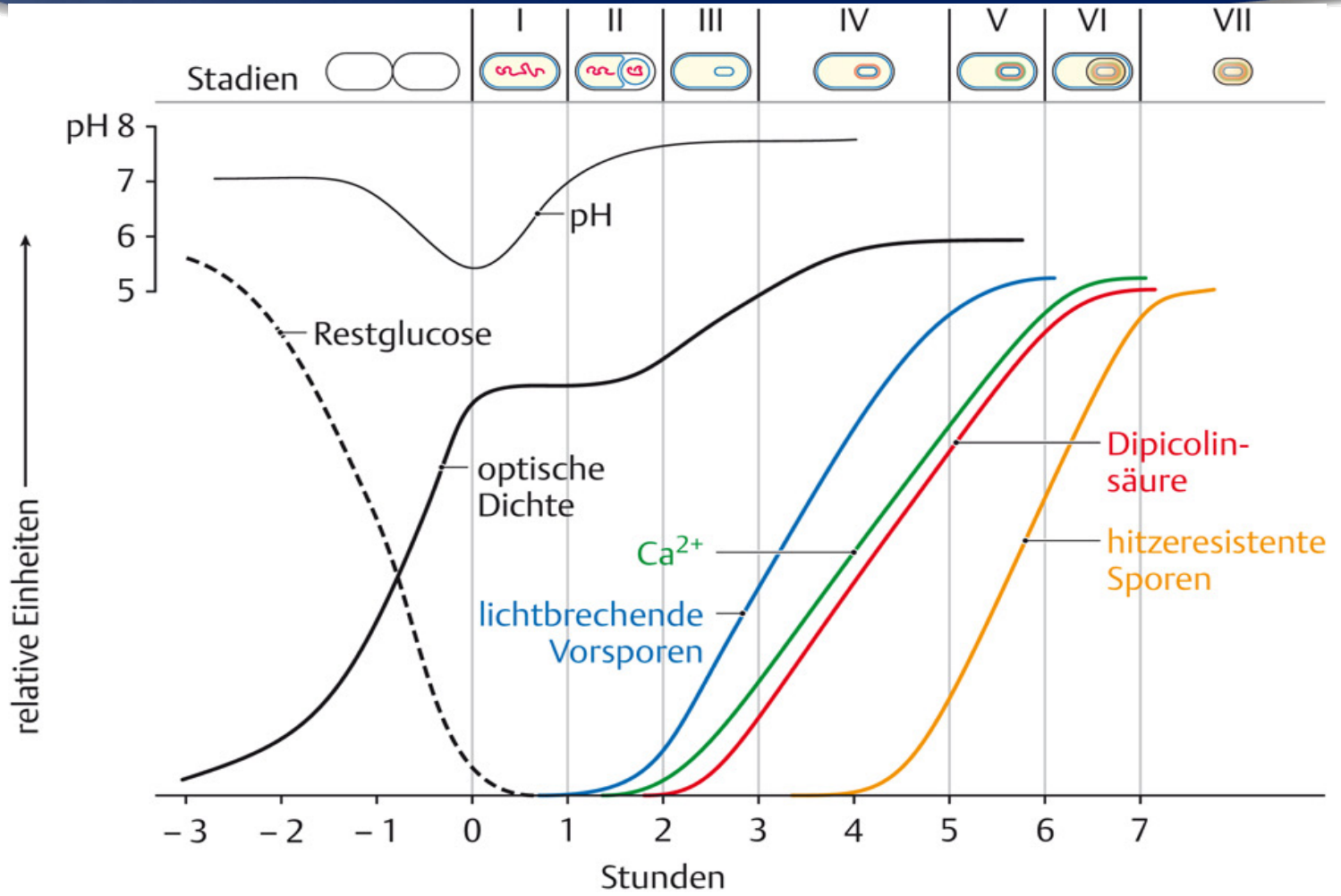
- Schutz vor chemischen Agenzien, hydrolytischen Enzymen)

- durchlässig für kleine Moleküle, z.B. Aminosäuren, Zucker (wichtig für Detektion von Nahrung, Auslösung der Sporenkeimung)

Auslösende Signale der **Sporulation:**

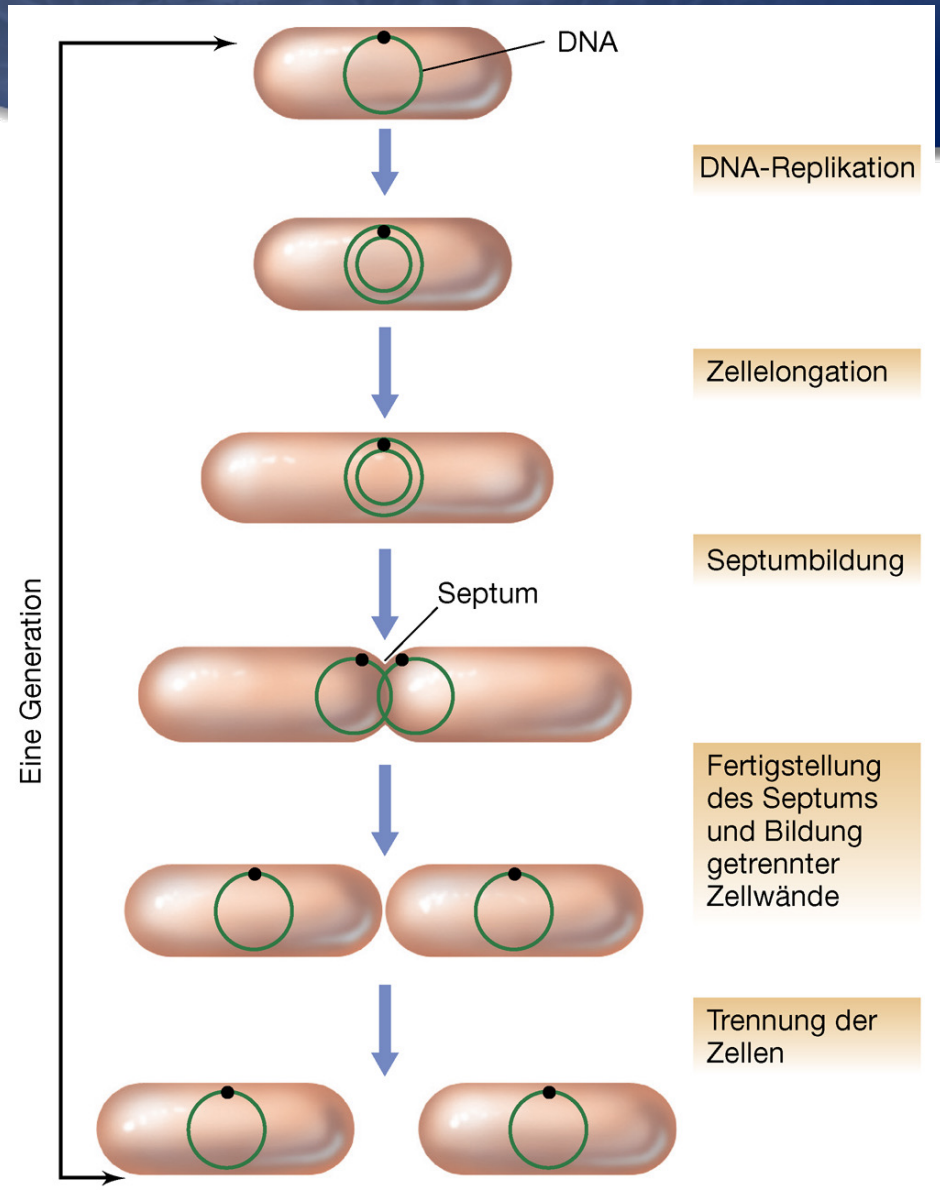
- **Nahrungsmangel** (C-, N- oder P- Limitierung)
- **hohe Zelldichte** („Quorum-sensing“)


Schritt 0
Vegetative Zelle
Zellwand
Cytoplasma-membran
DNA
DNA wird kondensiert
Schritt I
Schritt II
Sich entwickelnde Endspore
Schritt III
Das Septum der Endspore umwächst den Protoplasten (Umhüllung)
Vorsporen-bildung
Äußere Sporen-membran
Kern
Innere Sporen-membran
Dehydratisierung
Das Exosporium erscheint; die ursprüngliche Cortex wird zwischen den beiden Membranen gebildet
Schritt IV
Exosporium
ursprüngliche Cortex
Schritt V
Das Exosporium erscheint; die ursprüngliche Cortex wird zwischen den beiden Membranen gebildet
Schritt VI
Cortexschichten
ursprüngliche Cortex
Schritt VII
Exosporium
Kern
Freie Spore
Lyse der Zelle und Freisetzung der reifen Endospore



Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Fuchs et al.: Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage · 2006

Die Einlagerung der **Dipicolinsäure** geht einher mit Hitzetoleranz



Wachstum einer bakteriellen Zelle

FtsZ ist eines der zentralen Proteine für Zellteilung; Septumbildung

fts filamentous temperature sensitive

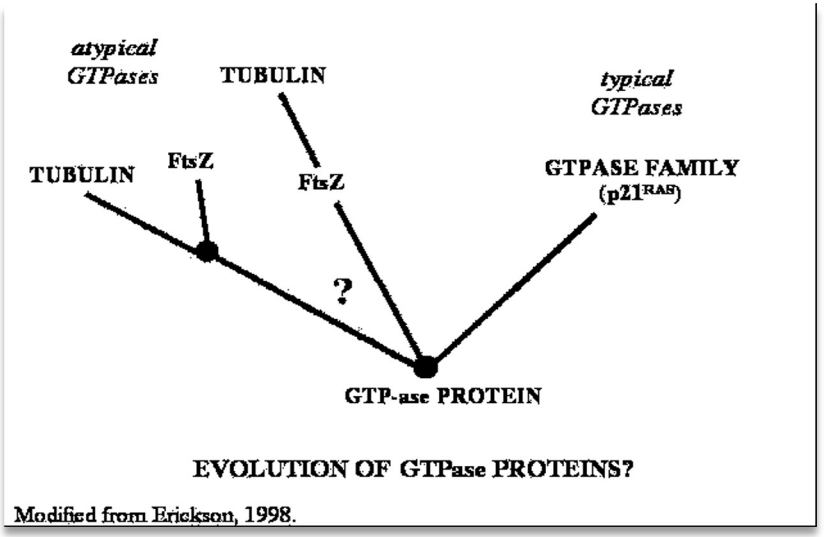
Vorkommen von FtsZ:
- Bakterien
- Archaea
- Mitochondrien
- Plastiden

und in Eukaryonten: Tubulin (wichtiges Teilungsprotein)

ftsZ-Mutante von *E. coli*

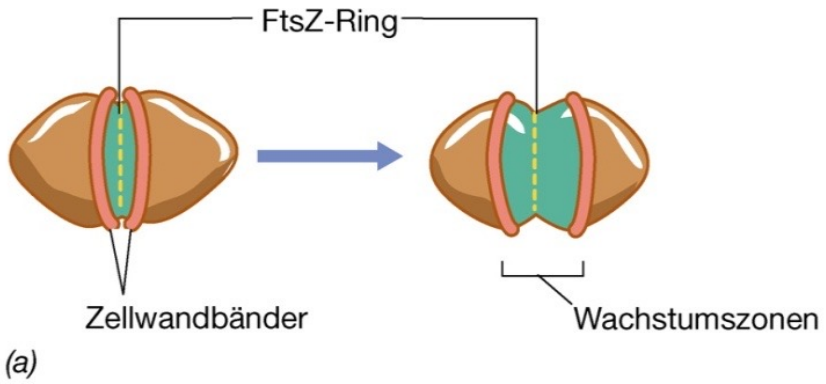
FtsZ- Key-Player für Zellteilung

Zentraler Prozess für Septierung:
Bildung des FtsZ-Rings

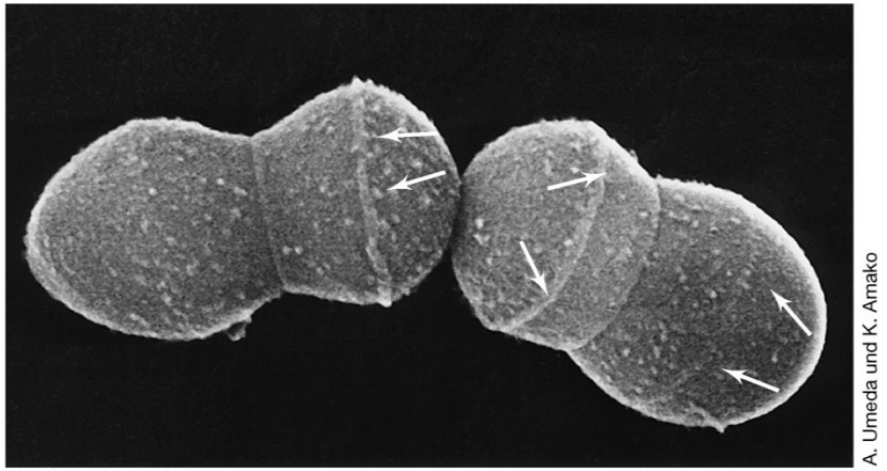


FtsZ:

- **hochkonserviert in Bakterien**
- **homolog zu eukaryotischem Tubulin**
- **besitzt die Fähigkeit zu polymerisieren und zu depolymerisieren**
- **bildet einen Ring an der Position, an der später das Septum gebildet wird**
- **induziert die Lokalisierung weiterer Proteine (z.B. FtsA)**



(a)

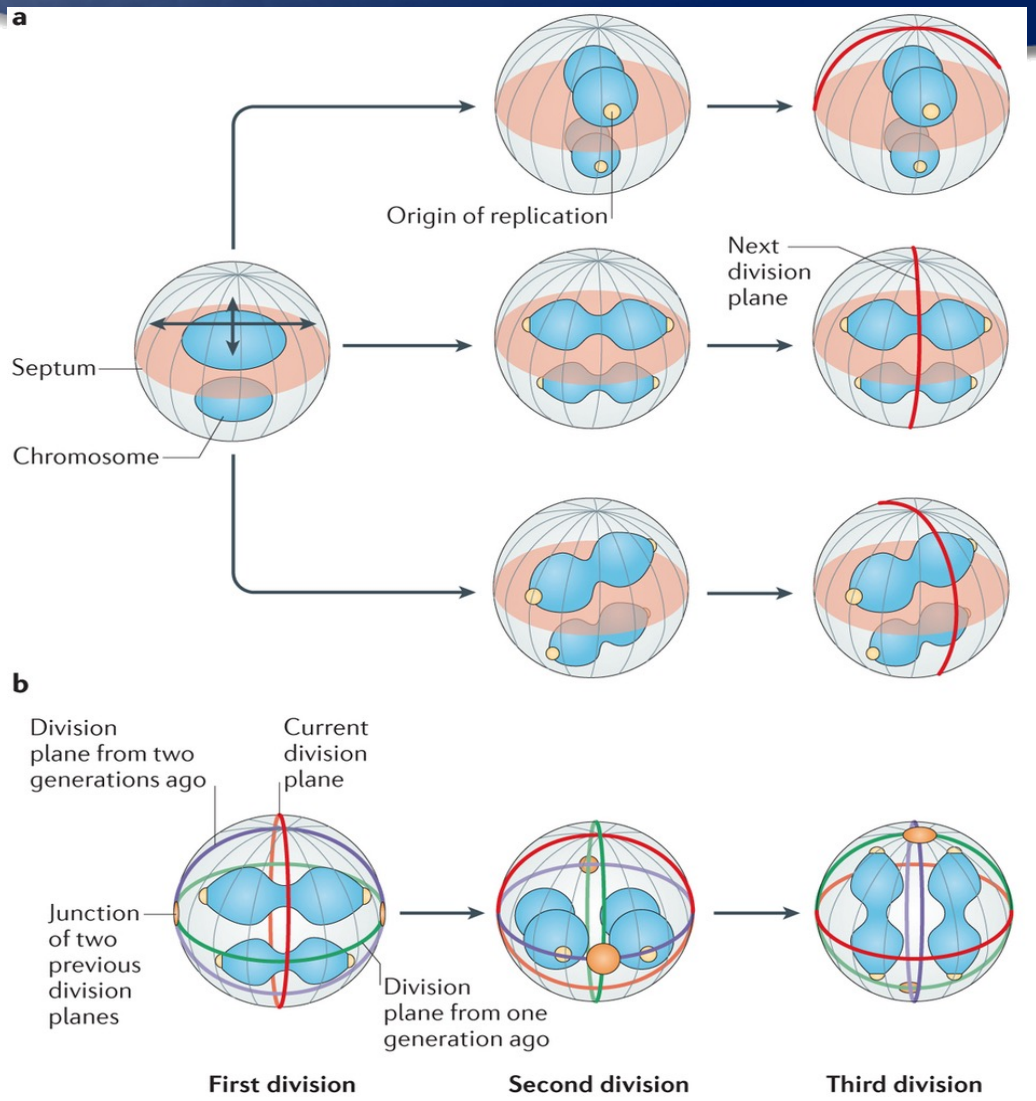


(b)

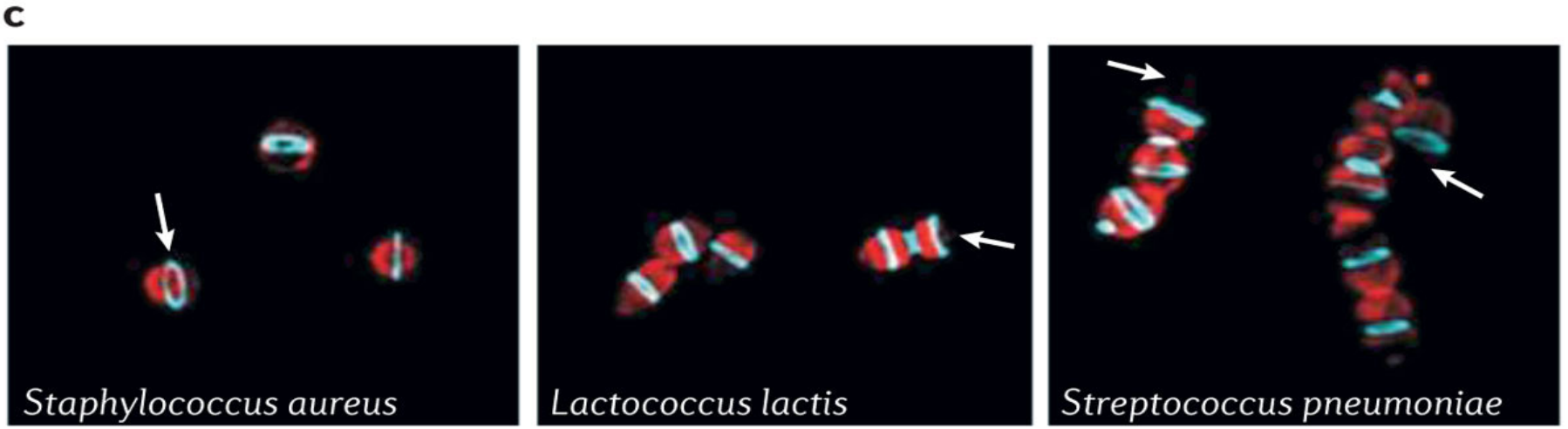
Zellwandsynthese bei Gram-positiven Bakterien

(a) Bestimmung des Ortes, an dem die Synthese einer neuen Zellwand während der Zellteilung stattfindet.
Der FtsZ-Ring definiert die Zellteilungsebene

(b) Zellen von *Streptococcus hemolyticus* mit Wandbändern (Pfeile), Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop



Zellteilung ist ein kontinuierlicher Prozess;
mehrere Teilungen laufen parallel



Nature Reviews | Microbiology

Peptidoglycanbiosynthese während der Zellteilung

Es wurden verschiedene Farbstoffe zur Sichtbarmachung der Zellen aus den diversen Teilungen verwendet

Anordnung einzelner **Divisomproteine**

- ZipA ist ein FtsZ-Anker
- FtsI ist ein Peptidoglykanbiosyntheseprotein
- FtsK unterstützt die Chromosomentrennung
- FtsA ist eine ATPase

Auftreten und Abbau des FtsZ-Rings während des Zellzyklus von *Escherichia coli*

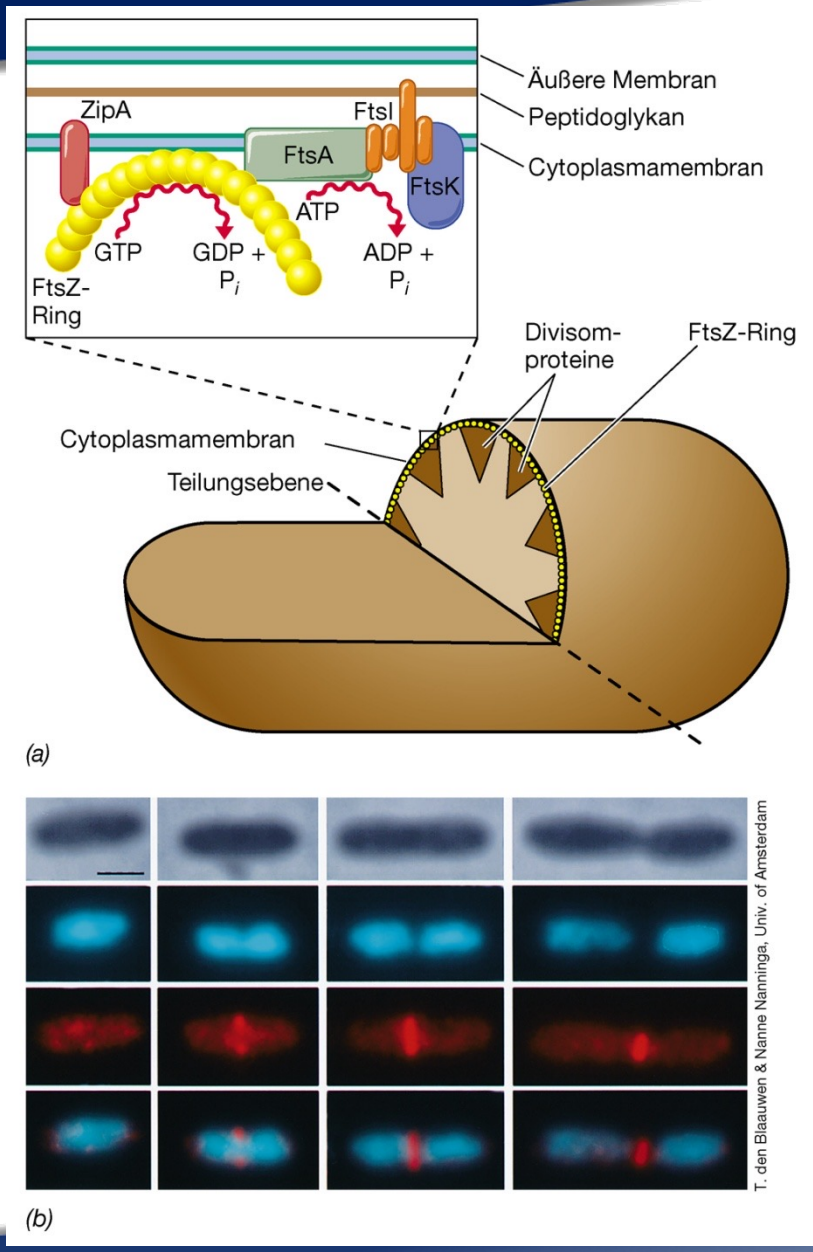
Mikroskopische Aufnahme:

Phasenkontrast

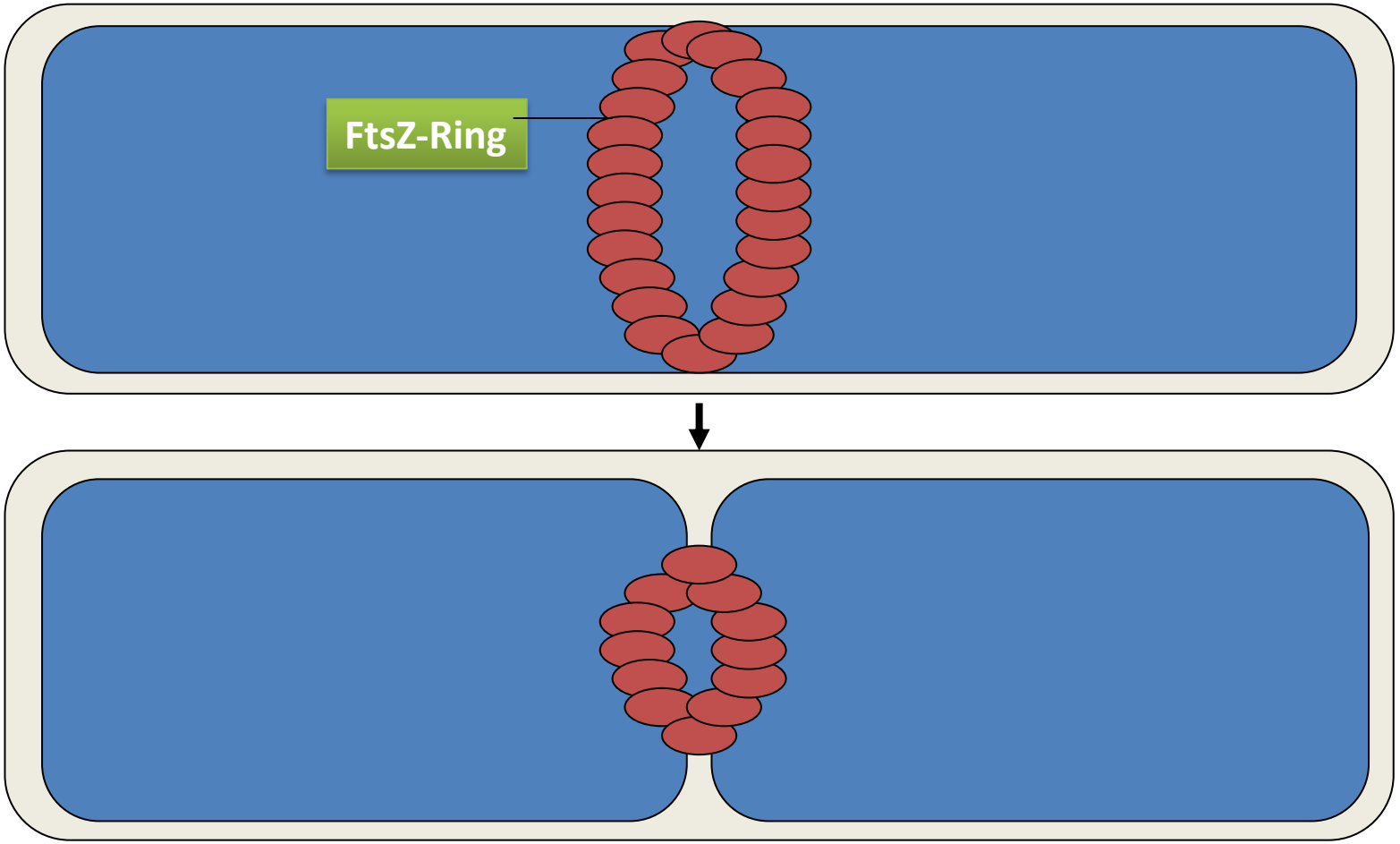
Nucleoidfärbung

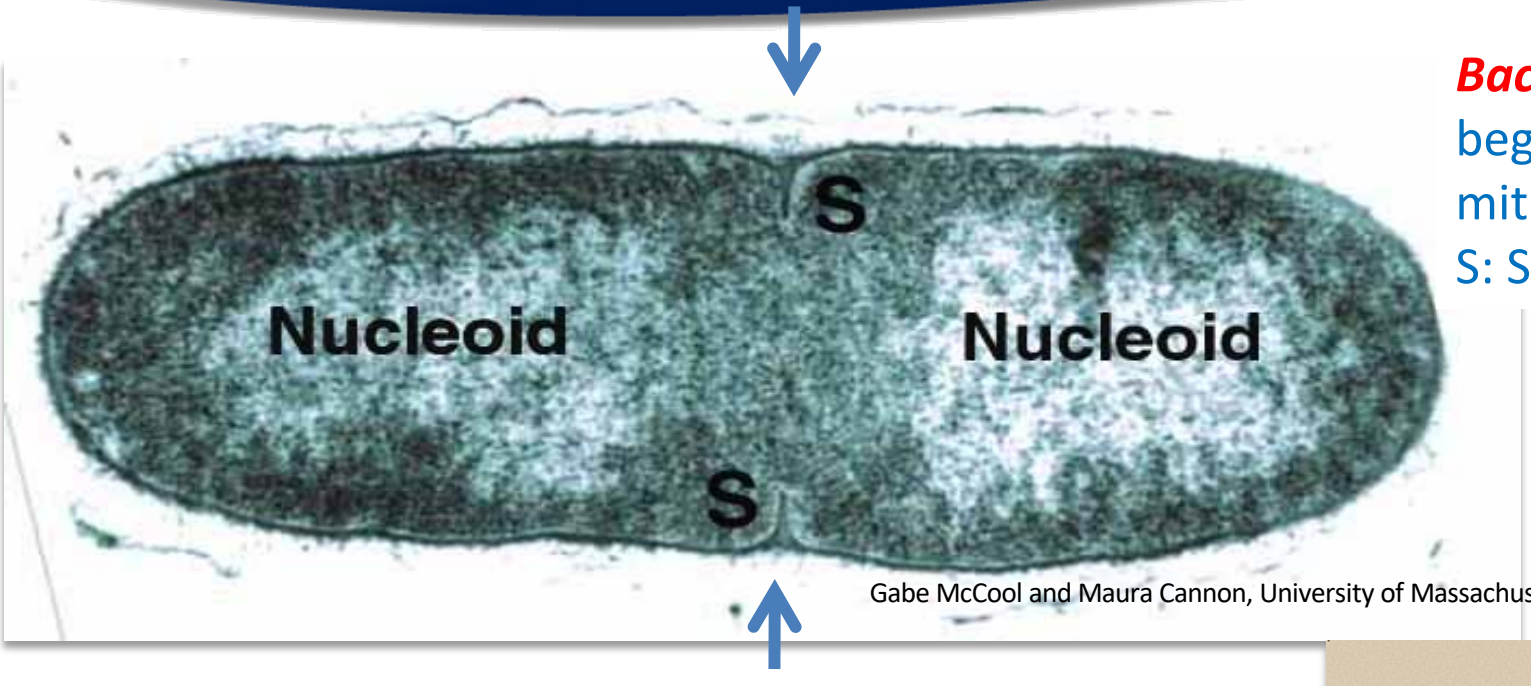
Zellen mit spezifischen Wirkstoff gegen FtsZ gefärbt

Kombination von Nucleoid- und FtsZ-Färbung



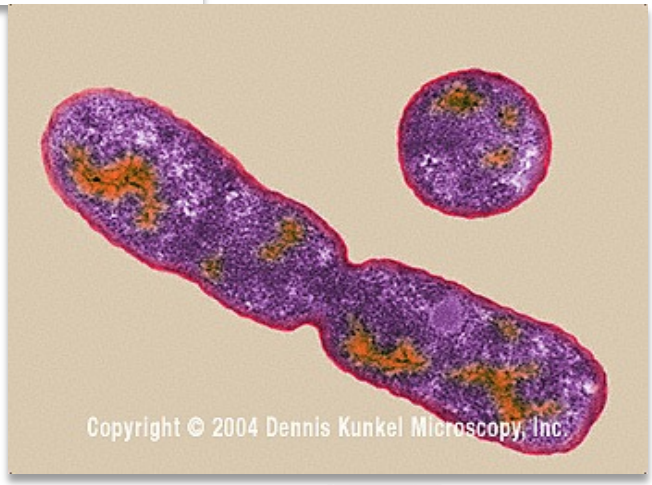
Der FtsZ-Ring in sich teilenden Zellen





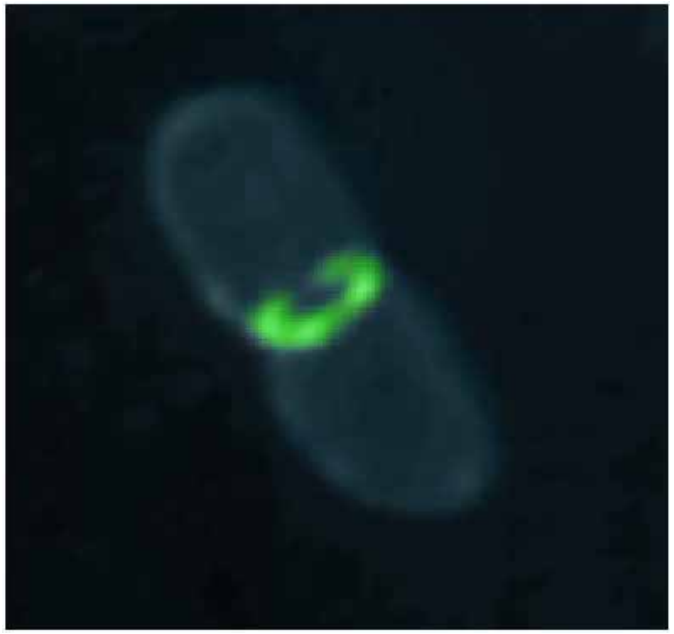
Gabe McCool and Maura Cannon, University of Massachusetts, Amherst.

Bacillus megaterium,
beginnende Zellteilung
mit Septumbildung
S: Septum



E.coli, Teilung fast abgeschlossen

Qin, S. and Margolin, J. Bacteriol. 180:.

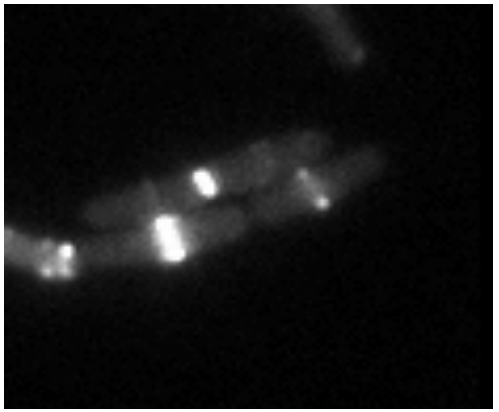


Ghigo.et al (1999)

FtsZ-GFP chimera protein Expression in *E. coli*

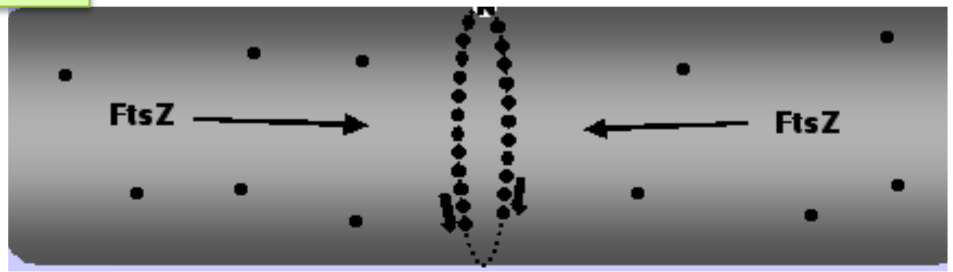
Erste real-time Dokumentation eines strukturellen Prozesses in der Zelle

Z-ring Assembly wird früh im Zell-Zyklus durchgeführt

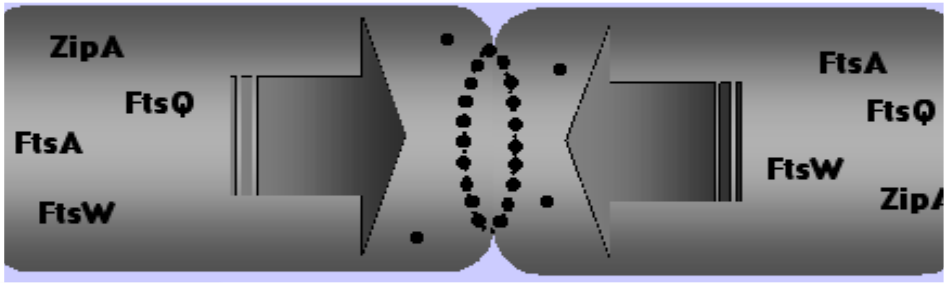


Osawa, Anderson and Erickson, Science 320:792, 2008

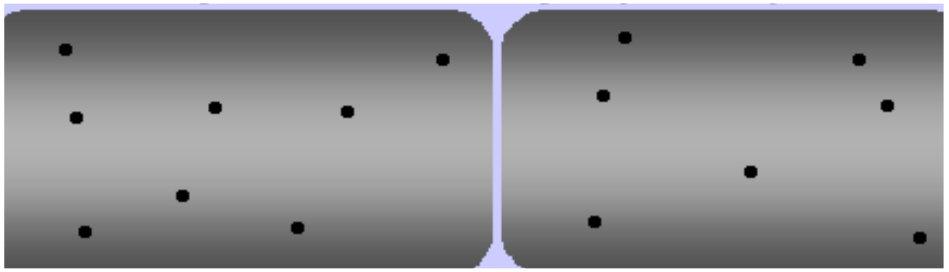
Selbstassemblierung von FtsZ zum Z-Ring



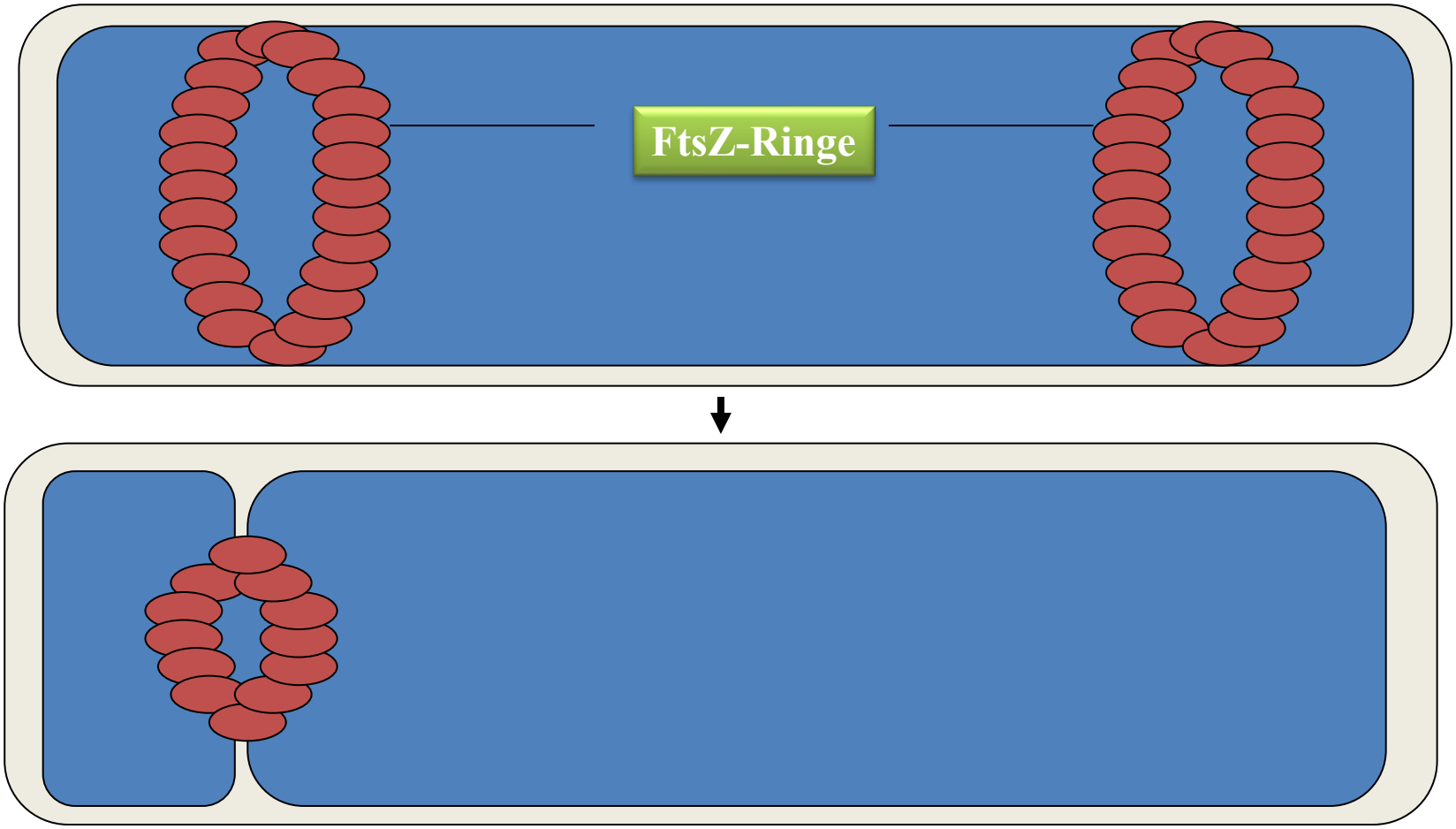
Andocken der anderen benötigten Proteine



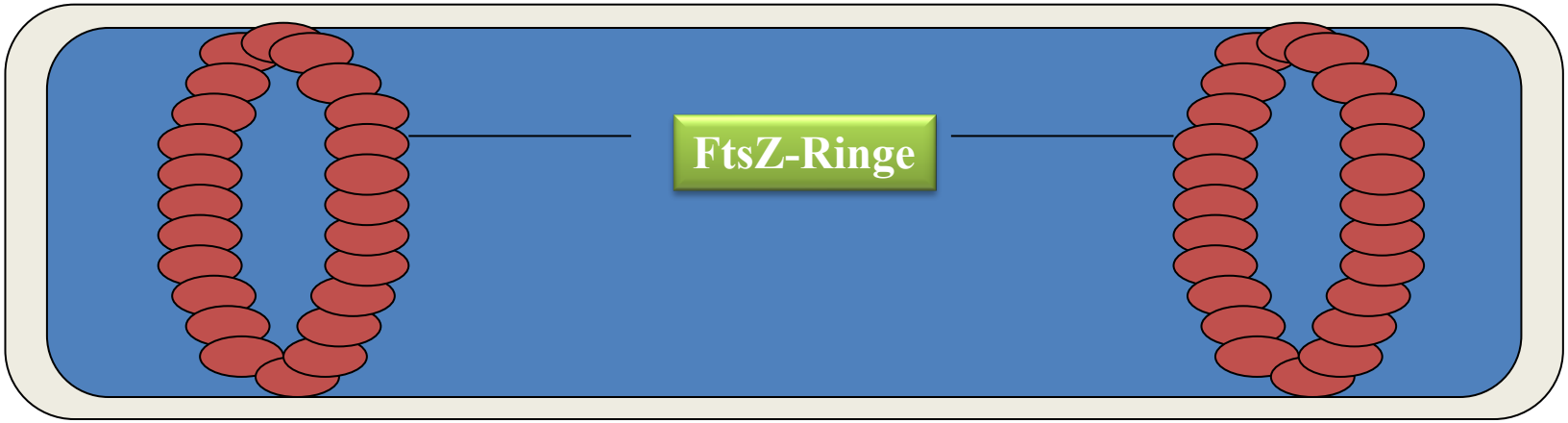
Dispersion des Z-Rings, Tochterzellen entstehen.



FtsZ-Ringe in sporulierenden Zellen

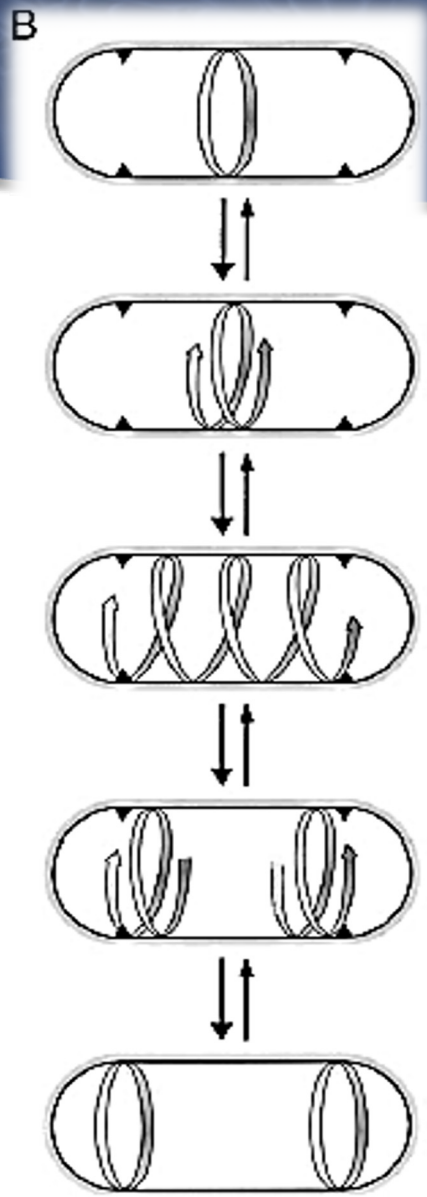


FtsZ-Ringe in sporulierenden Zellen



DivIVa
sitzt am Pool und zieht
die DNA auseinander

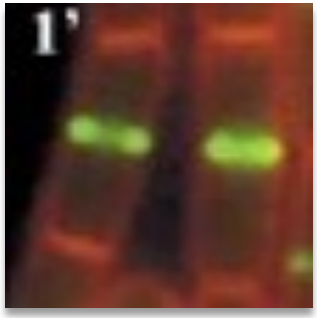
RacA-DNA-Bindeprotein



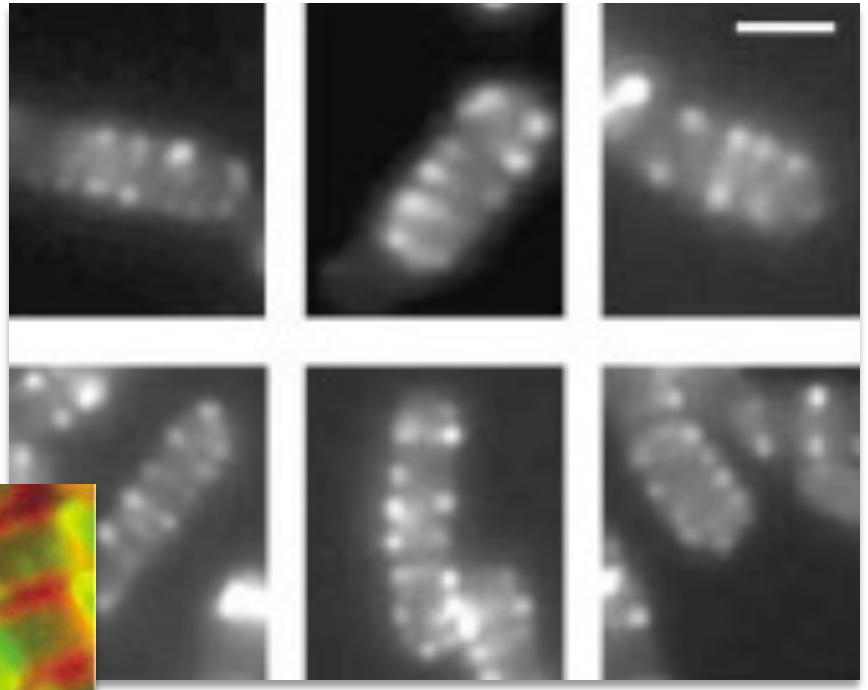
Modell für die Bildung polarer FtsZ-Ringe

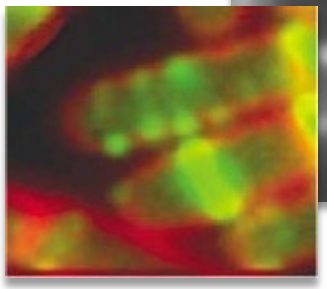
Voraussetzung für Spiralbildung:
erhöhte Produktion von FtsZ zu
Beginn der Sporulation

Zelle mit fluoreszierendem FtsZ

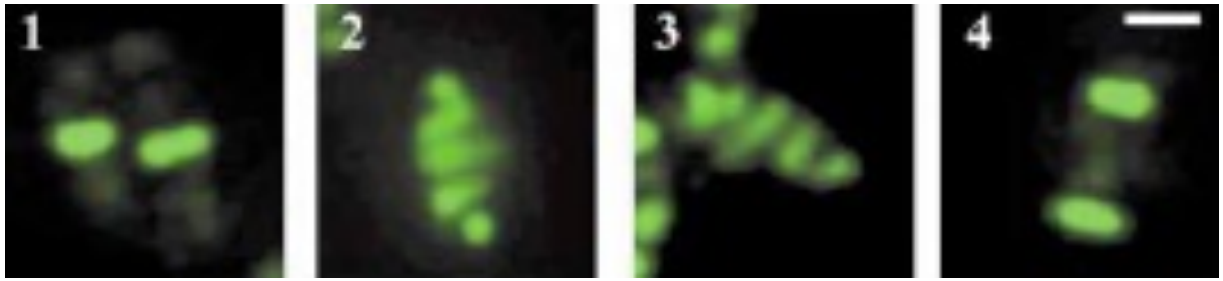


FtsZ 90 min nach Beginn der Sporulation





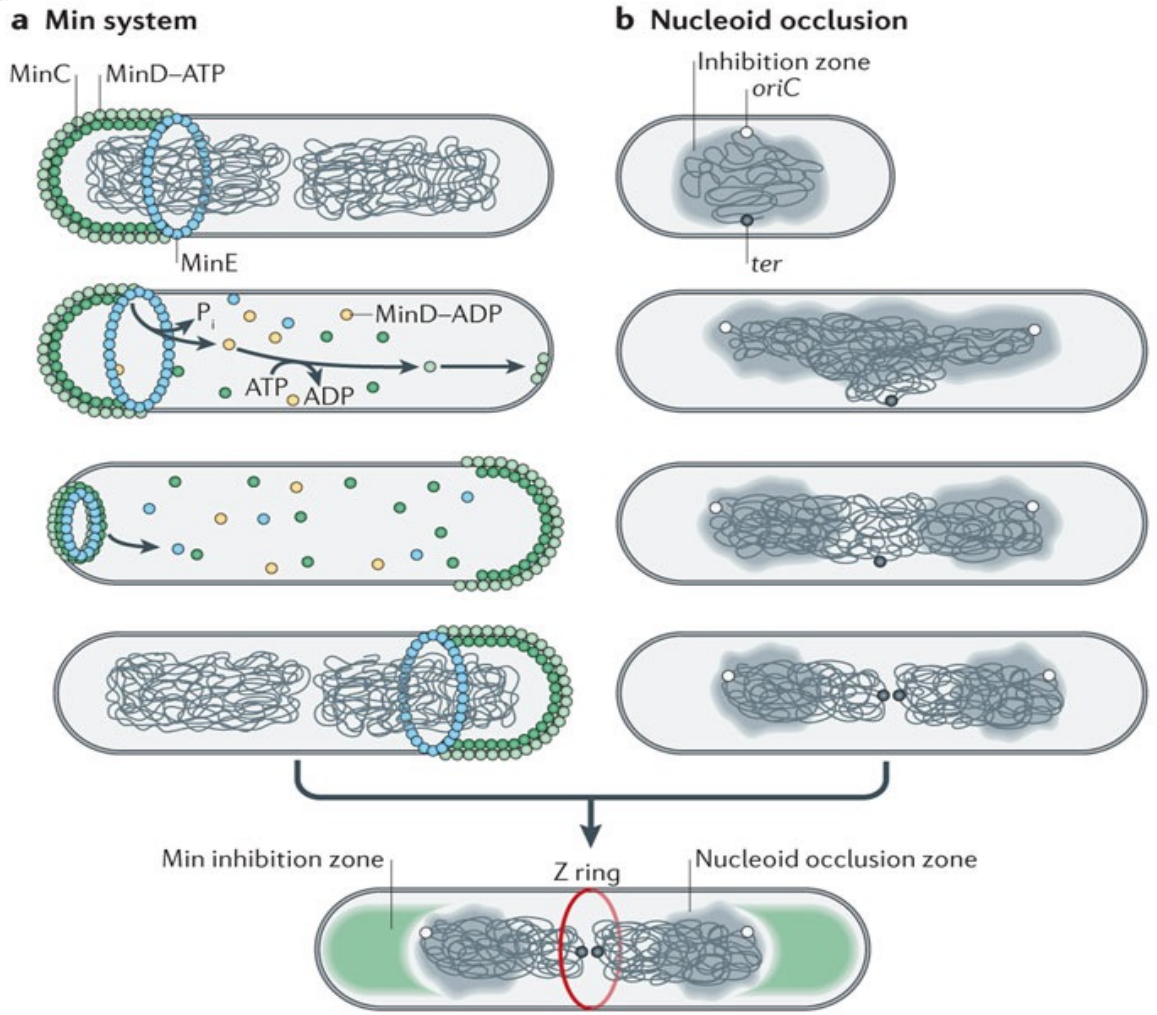
Dreidimensionale Aufnahmen der FtsZ-Spiralen



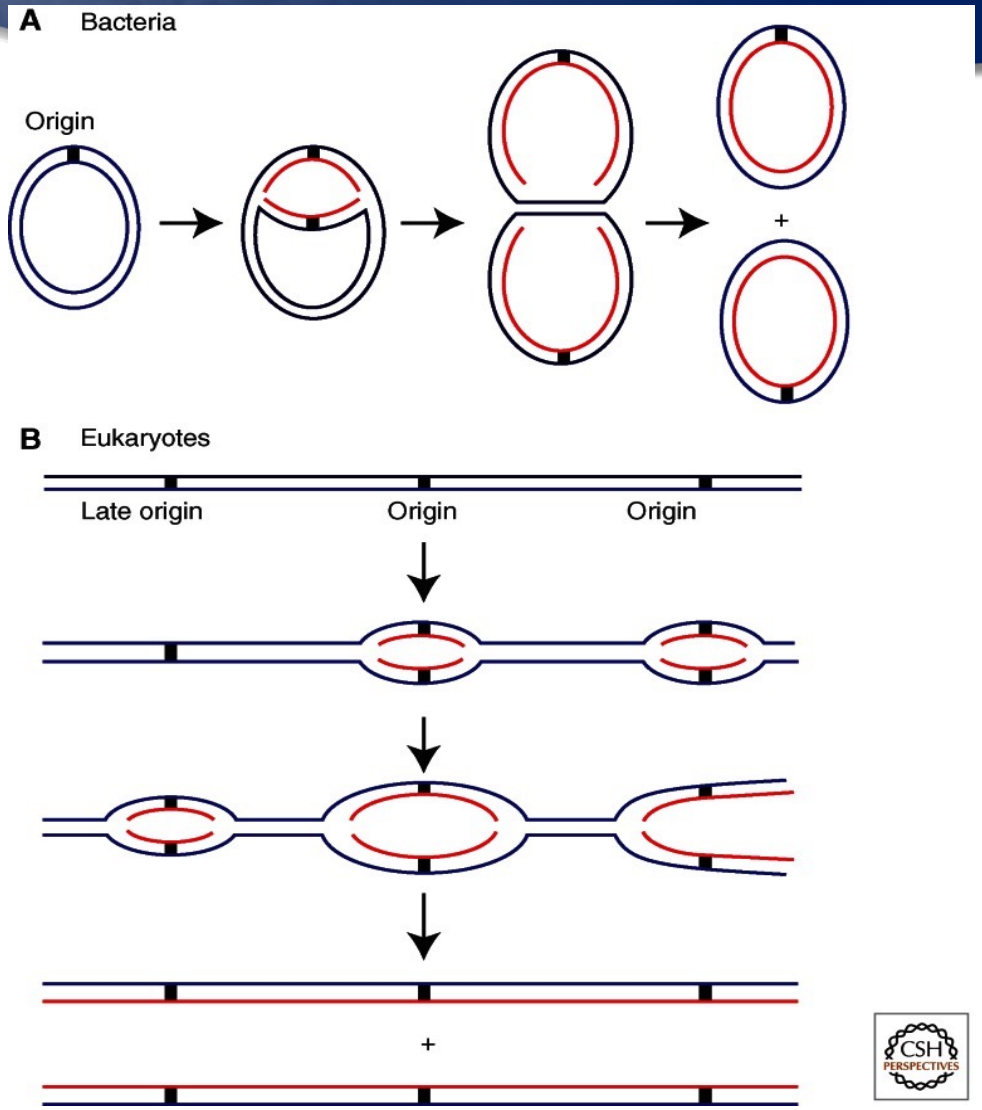
0 min **90 min** **120 min**

Ben-Yehuda und Losick, Cell, Vol. 109, 257-266 (2002)

MinCDE Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Positionierung des Septums

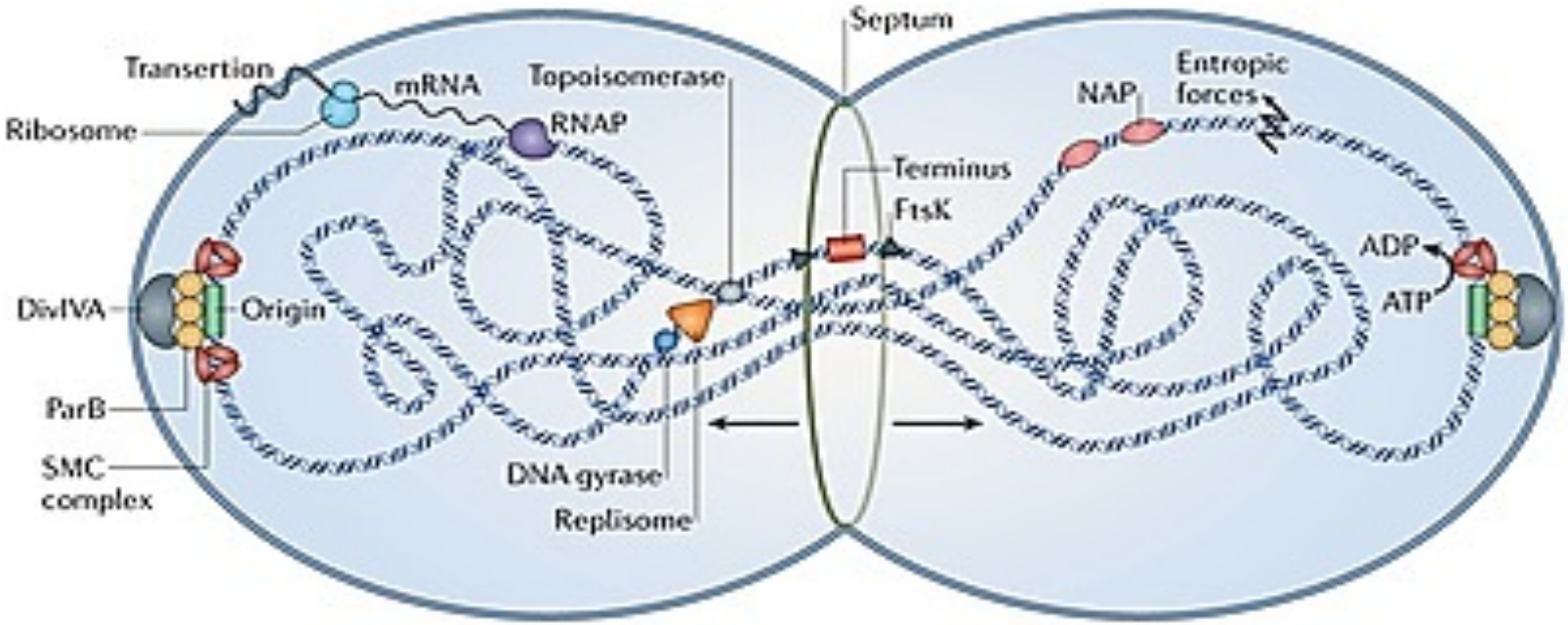


Nature Reviews | Microbiology

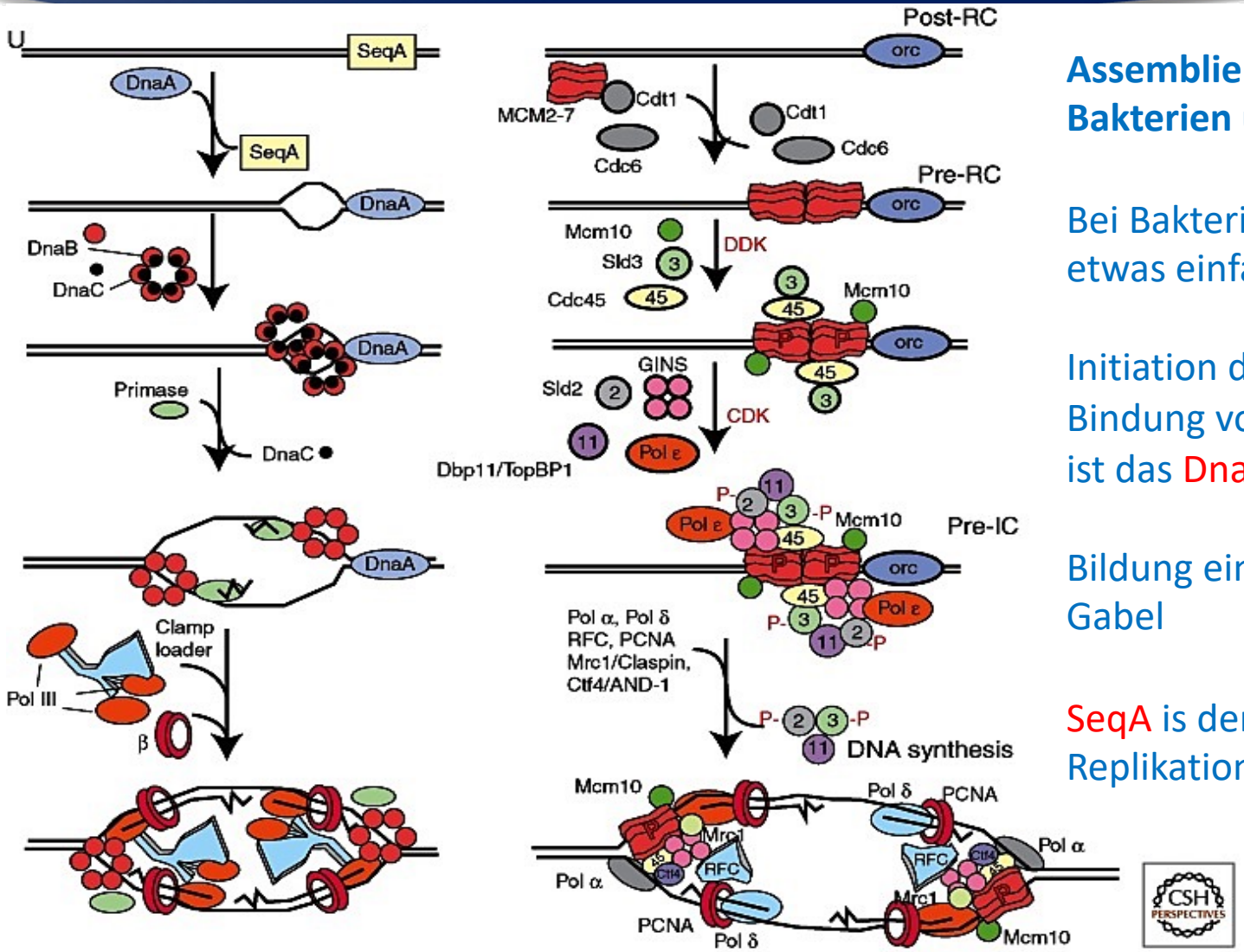


Die Replikation startet bei Bakterien am oriC/V in entgengesetzte Richtungen.
Bakterielle Chromsomen und Plasmide sind meist circulär!

Die Replikation startet bei den Eukarya an verschienden ‘oris’ parallel und bidirektional.



Nature Reviews | Microbiology



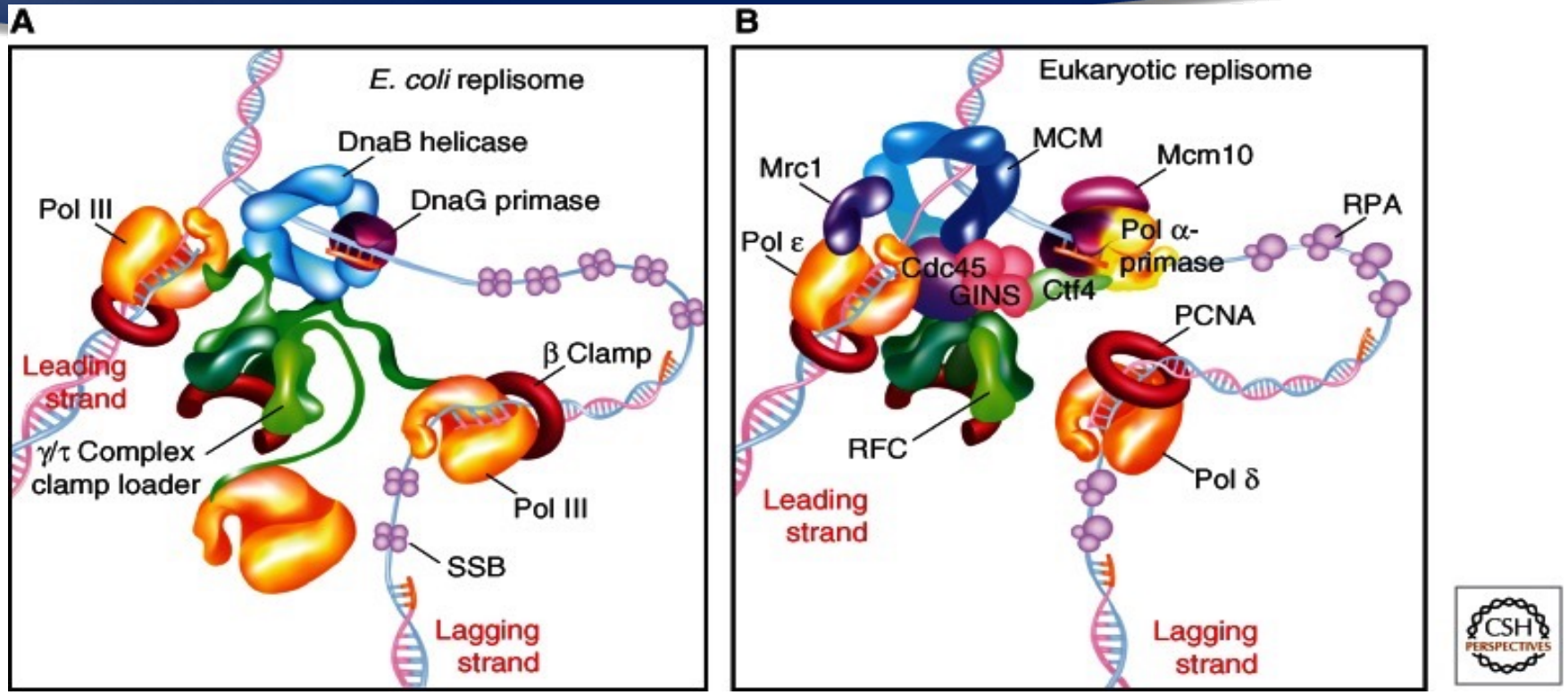
Assemblierung des Replisoms in Bakterien und Eukarya

Bei Bakterien weniger Proteine, etwas einfacherer Aufbau

Initiation der Replikation durch Bindung von Helikasen: in Bakterien ist das DnaA und DnaB

Bildung einer Replikationsblase/-Gabel

SeqA is der Hauptschalter für die Replikation, es bindet an den OriV



Assemblierung des Replisoms in Bakterien und Eukarya

Bei Bakterien Pol III an zwei Stellen (Leading und Lagging Strand)

DNA Helikase

Primase

Clamp

SSB, single strand binding protein